

抹茶投与がマウスの行動に及ぼす影響

上江洲 香代子

Effects of powdered green tea on behavior in young mice

Kayoko Uezu

Abstract

To investigate the effects of powdered green tea on behavior in young mice, 4 weeks old male ddY mice were fed experimental diet containing 0.001% powdered green tea or control diet. At the age of 8-9 weeks, several behavioral tests were performed. Mice fed experimental diet showed increased number of walking in open-field test and stayed significantly longer in the open arm on elevated plus maze. There was no difference between the two groups on memory retention in step-through type passive avoidance test. These results suggest that powdered green tea may have anti-anxiety effects.

I. 緒言

緑茶は日本人が多く消費している飲料で、古くから健康長寿の秘訣とされてきた。緑茶にはテアニンという特有のアミノ酸が豊富に含まれており、脳の α 波の放出を促進させる効果があるといわれている¹⁾。そのテアニンのリラックス効果を利用して、精神の安定化の薬として使用し、ストレスを軽減させることができるのではないかと考えられている¹⁾。テアニンがアセチルコリンなどの神経伝達物質の動態に作用することや、学習記憶能力の向上、血圧降下作用、脳虚血障害に対する効果なども報告されている。また、茶カテキンにも、抗酸化、抗がん、学習記憶能力の向上、コレステロール低下、抗アレルギー作用などの多くの生理作用があるといわれている^{2,3)}。

抹茶はツバキ科ツバキ属の茶の木(学名: *Camellia sinensis*)を覆下栽培で直射日光を避けるようにした茶畑で育て、蒸して乾燥させたものを石臼によって5 μ mの超微粉にしたものである。他のお茶と違い、茶葉を初期の段階で日光を遮って育てることにより、テアニンなどのアミノ酸類が他に比較して豊富に含有されており、また湯に懸濁状態で飲用されるため、水溶性成分だけでなく脂溶性成分や生理活性成分、食物繊維も摂取できる^{2,4)}。

今回の研究は、抹茶がマウスの行動にどのような影響を及ぼすのかを検討する目的で実験した。

II. 実験方法

1) 動物と飼育条件

動物は4週齢雄のddY/SPFマウス(日本SLC, 静岡)を購入し、コントロール群(7匹)と抹茶群(7匹)の2群を設定して、実験食で6週間飼育した。表1には、コントロール群の食餌組成

を示した。抹茶群には、これに重量の0.001%の割合で市販の抹茶を添加したものを与えた。餌の投与は月～土曜に行い、毎回新しい餌を与えた。飼育環境はコンベンショナルで、室温 25 ± 1 ℃、12時間明暗周期（8:00～20:00）に保ち、実験期間を通して餌と水は自由摂取とし、摂餌量を毎日、体重を週2回測定した。動物実験は動物の福祉に配慮して行われた。

表 1. コントロール群食餌組成

カゼイン	24g
α -コーンスターチ	42g
スクロース	21g
セルロース	2g
ミネラル混合	5g
ビタミン混合	1g
大豆油	5g
計	100g

実験食群には、抹茶を0.001%の重量比で添加した。

2) 行動試験

実験食投与開始後4週目から5週目にかけて、一般活動性試験（①オープンフィールド試験）、抗不安作用試験（②高架式十字迷路試験）、学習・記憶試験（③ステップスルー型受動的回避試験）の行動試験を実施した（図1）。

①オープンフィールド試験

マウスを全く経験したことのない新しい環境（オープンフィールド）に置いたときのさまざまな行動は、マウスの運動活動性、探索行動および種々の情動反応を反映するものといわれている。種々の薬物の行動への影響を見るうえで最も基本的な指標として応用されている。

実験装置（図1：A）は、 $44 \times 44 \times 33$ cm（縦×横×高さ）のダンボール箱の床面に 5.5×5.5 cm（縦×横）の区画を25個引いたものを使用した。観察時間は、マウスをホームケージから取り出し、箱の中に入れてから3分間とした。観察項目として、(1)床面の区画から区画へ移動したときの通過区画の数（＝歩行数とする）、(2)立ち上がった回数、(3)洗顔・毛づくろいの時間、(4)脱糞の数、(5)尿の有無について測定した。(1)と(2)の数が多いほど探索行動が多いことを示す。一般的にオープンフィールドに置かれた直後は探索行動が活発である。(3)は数が多いほど情動が安定していることを示す。オープンフィールドに慣れてくると増える。(4)(5)は強いストレスなどの極端に情動の不安定な状態で増加する。

②高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験は、げっ歯類が高い位置にある解放された場所を嫌う習性を利用して、マウスやラットの恐怖心を評価するための装置として開発された物であり、抗不安薬などのスクリーニングなどに用いられている。床上60cmの高架にある十字路は、一対は高さ10cmの壁のある 30×5 cmの細長い通路（クローズドアーム）が向かい合い、もう一対は壁がない 30×5 cmの細長い通路（オープンアーム）が向かい合う装置を使用した（図1：B）（YTS山下技研，徳島）。

アームが交わった中央部分にマウスを置いてから3分間を観察時間とし、それぞれのアームへの進入回数及び滞在時間を計測して、恐怖心の度合いを観察した。オープンアームへの進入回数多ければ、または滞在時間が長ければ、恐怖心が低下している（抗不安作用がある）と判断した。

③ステップスルー型受動的回避試験

ステップスルー型受動的回避試験は、マウスの〈暗い場所を好む〉という行動特性を、電気ショックによって抑制することを利用する簡便な学習記憶実験である。実験装置（図1：C）は白色光で照明した明室（10×10×10cm）と床にグリッドを取り付けた暗室（15×15×15cm）からなり、二室の間は可動式の上下開閉ドアで仕切られているものを使用した（YTS山下技研，徳島）。

マウスを明室に入れて10秒後に仕切りのドアを開け、マウスが暗室に移動し、四肢を完全に暗室に移動したところでドアを閉め0.2mA、0.5秒間の電気ショックを1回付加した（一試行型）。この時点で電気ショック回避反応の習得が完成すれば、以後暗室内に入ることはないが、記憶が弱まれば暗室に入っていくという考えの下に、同一のマウスについて24時間後と1週間後に再生試行を行い、記憶試験とした。マウスが明室に入れられ暗室へ移動するまでの時間を反応潜時として測定し、180秒を最高反応潜時とした。潜時が長い程、記憶が保たれていると判断した。



図1. 行動試験装置の模式図

3) 統計処理

データは平均値±標準誤差で表した。有意差検定はMicrosoft Excel X を用い、スチューデントの t 検定により行った。

Ⅲ. 結 果

図2には体重の変化および食餌摂取量を示した。実験期間を通しての体重増加量は、コントロール群（19.8g±0.75g）と抹茶群（19.8g±1.16g）の間で差はなかった。食餌摂取量においても両群で差はなかった。飼育期間中の観察では、両群ともに異常な行動や外観を示す動物はなかった。

図3にはオープンフィールド試験の結果を示した。コントロール群に比較して抹茶群で、歩行数や立ち上がり回数が幾分多く、探索行動の指標が高い傾向が見られたが有意差はなかった。情動の指標となる洗顔・毛づくろい時間はコントロール群が多い傾向にあったが、脱糞数や尿の有無には差がなかった。

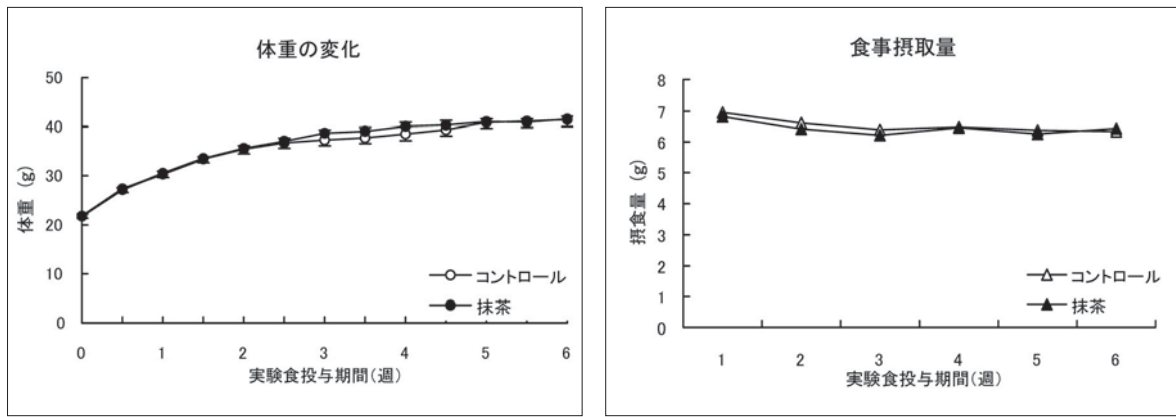


図2. 体重の変化と摂餌量の変化

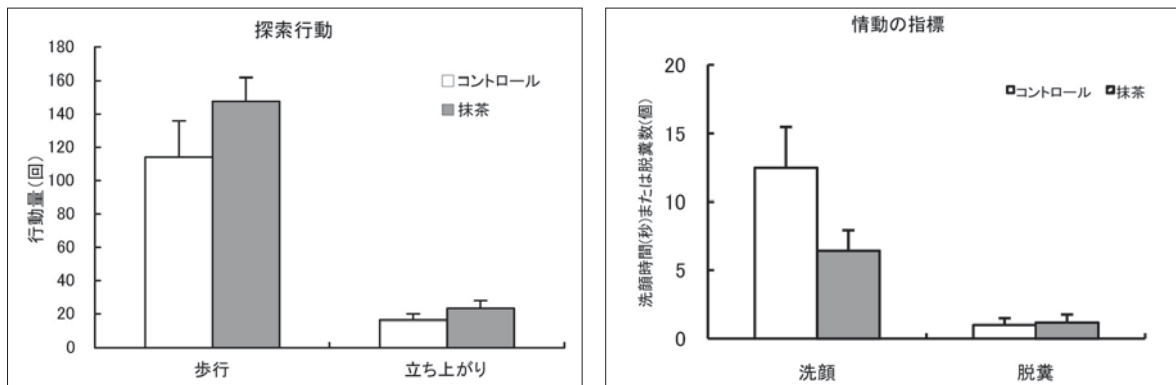


図3. オープンフィールド試験

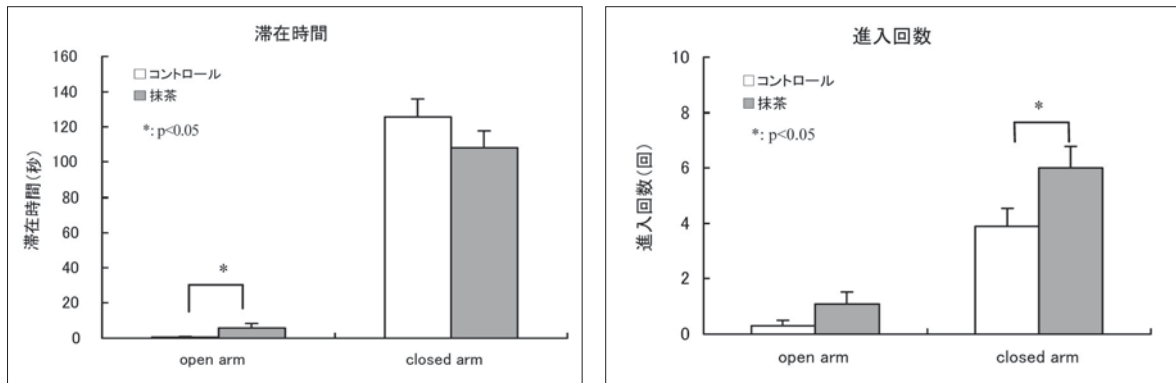


図4. 高架式十字迷路試験

図4には高架式十字迷路試験の結果を示した。抹茶群の方がコントロール群に比較してオープンアームでの滞在時間が有意に長くなった。進入回数においては、オープンアーム、クローズドアーム共に抹茶群の方が多くなった。つまり抹茶群は活発に行動するため、両アームへの進入回数と滞在時間共に多くなったと考えられ、活動的で、恐怖心を抱くことが少ないと思われる。

図5に示したステップスルー型受動的回避試験では、24時間後、1週間後も反応潜時に両群で差が見られなかった。このことから、抹茶0.001%は記憶に影響を及ぼさないと考えられる。

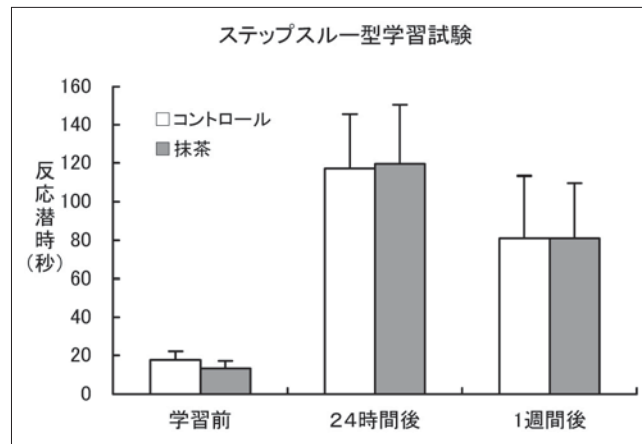


図5. ステップスルー型受動的回避試験

IV. 考 察

今回の実験では、体重増加量や食餌摂取量、飼育期間中の様子観察において抹茶群とコントロール群の間に差は見られなかった。またオープンフィールド試験では、抹茶群でやや高い探索行動が見られたが統計的有意差はなく、情動の安定性にも差が見られなかった。これらのことから、抹茶0.001%投与はマウスの成長や一般活動性、感覚機能、運動機能、情動などへの悪影響はなかったと考えられる。

抗不安作用を調べる高架式十字迷路試験では、通常は恐怖を感じるであろうと考えられるオープンアームへの進入回数、滞在時間ともに抹茶群で多い傾向が見られたことから、抹茶の抗不安作用が示唆された。緑茶中の旨味成分であるL-テアニンはグルタメート受容体への拮抗作用を示すことが知られ、抑制性神経の活動を促進し、興奮性神経を抑制することが知られている⁵⁾。L-テアニンのマウス腹腔内投与により脳内GABA量が増加したという報告もある⁶⁾。L-テアニン投与により人の睡眠の質が改善されたという報告や⁷⁾、心理的生理的ストレス反応が軽減されたという報告⁸⁾、緑茶を多く摂取すると高齢者の鬱症状が軽減されたという報告⁹⁾などがある。今回の実験では、市販の抹茶粉末を用いたが、その中のテアニンが抗不安作用を示したことが推測される。

ステップスルー型受動的回避試験における学習記憶試験では、24時間後、1時間後とも反応潜時に差が見られなかったことから、抹茶0.001%添加は記憶保持能力に影響は及ぼさないと考えられる。緑茶中のカテキンは強い抗酸化能を有し、カテキン投与によりラットの海馬での活性酸素量を減少させ、空間認知機能を改善したという報告¹⁰⁾や、マウスのコリン作動性神経に関与して記憶を改善したという報告^{11,12)}、マウスの脳委縮が軽減されたという報告¹³⁾など、多くの学習記憶や認知機能に関するカテキンの効果報告がある。テアニン投与もラットの脳虚血による記憶障害を改善するという報告¹⁴⁾や、高齢者の認知症予防効果があるという報告¹⁵⁾などがある。緑茶、またはその抽出物のテアニンあるいはカテキンの投与実験は多いが、今回の実験では茶葉全体を摂取できる抹茶を使用し、若い動物を使用した。抹茶の通常の摂取量の約10倍程度と見積もり、0.001%重量比を4~5週間投与したが、学習記憶に効果が見られなかったのは投与期間が短かったか、動物が若齢であったためである可能性が考えられる。

今回の実験の抹茶0.001%重量比投与は、若齢マウスにおいて抗不安作用を示唆したが、学習記

憶には影響を及ぼさなかった。抹茶にはテアニンやカテキン、ビタミンCなどの他に脂溶性のビタミンEや β -カロテンなども多く含まれ、これらの効能も含めて今後更なる検討を要すると思われる。

参考文献

- 1) Kobayashi K., Nagato Y., et al.: Effects of L-theanine on the release of alpha-brain waves in human volunteers, *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 72(2), 153-157, (1998)
- 2) 大槻耕三：抹茶のススメ－緑茶から抹茶へ－：京都府立大学図書館報 ながらぎ 166号, (2004)
- 3) Chan Y.-C., Hosoda K., et al.: Favorable effects of tea on reducing the cognitive deficits and brain morphological changes in Senescence-Accelerated Mice, *J Nutr Sci Vitaminol*, 52, 266-273, (2006)
- 4) お茶はなぜ体によいのか－カテキンパワーの秘密－：黒田行昭、原征彦共著, (1999)
- 5) Kakuda T., Nozawa A., et al.: Inhibitory by theanine of binding of [3 H]AMPA, [3 H]kainite, and [3 H]MDL 105,109 to glutamate receptors, *Biosci Biochem Biochem*, 66(12), 2683-2686, (2002)
- 6) Kimura R, and Murata T.:Influence of alkylamides of glutamic acid and related compounds on the central nervous system. I. Central depressant effect of theanine, *Chem Pharm Bull*, 19(6), 1257-1261, (1971)
- 7) 小関誠, レカ・ラジュ・ジュネジャ, 他：アクチグラフを用いたL-テアニンの睡眠改善効果の検討, *日本生理人類学会誌*, 9(4), 13-20, (2004)
- 8) Kimura K., Ozeki M., et al.: L-Theanine reduces psychological and physiological stress responses, *Biol Psychol*, 74(1), 39-45, (2007)
- 9) Niu K, Hozawa A., et al.: Green tea consumption is associated with depressive symptoms in the elderly, *Am J Clin Nutr*, 90, 1615-1620, (2009)
- 10) Haque A.M., Hashimoto M., et al: Long-term administration of green tea catechines improves spatial cognition learning ability in rats, *J Nutr*, 136, 1043-1047, (2006)
- 11) Kim M., Kim H.-K., et al.:Effects of green tea polyphenol on cognitive and acetylcholinesterase activities, *Biosci Biochem Biochem*, 68(9), 1977-1979, (2004)
- 12) Kaur T., Pathak CM., et al.: Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats, *Brain Cogn*, 67(1), 25-30, (2007)
- 13) Unno K., Takabayashi F., et al.:Suppressive effect of green tea catechine on morphologic and functional regulation of the brain in aged mice with accelerated senescence (SAMP10), *Exper Gerontol*, 39(7), 1027-1034, (2004)
- 14) Egashira N., Ishigami N., et al.: Theanine Prevents memory impairment induced by repeated cerebral ischemia in rats, *Phytother Res*, 22, 65-68, (2008)
- 15) 片岡 洋祐, 宇都宮一泰, 他：テアニン高含有緑茶抹茶摂取による高齢者の認知症予防効果, *日本未病システム学会雑誌*, 15(1),17-23, (2009)

(2011年1月31日受理)